

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-223674

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)10月2日

G 01 N 33/543  
C 12 M 1/34  
G 01 N 35/08

P 7906-2G  
F 8717-4B  
E 7403-2G

審査請求 未請求 請求項の数 27 (全32頁)

⑮ 発明の名称 反応容器

⑯ 特 願 平2-303067

⑰ 出 願 平2(1990)11月8日

優先権主張 ⑱ 平1(1989)11月30日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 平1-312122

㉑ 発 明 者 持 田 英 東京都豊島区駒込2-5-4

㉒ 出 願 人 持田製薬株式会社 東京都新宿区四谷1丁目7番地

㉓ 代 理 人 弁理士 渡辺 望 稔 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

反応容器

2. 特許請求の範囲

(1) 構体内に、少なくとも1個の流体入口を有する通路を有し、該通路の途中であって全ての流体入口よりも下流側に少なくとも1個の試薬固定部分を有し、かつ、通路と連通する排気機構を有する反応ユニットを少なくとも1個有することを特徴とする反応容器。

(2) 前記排気機構が、前記通路に設けられた少なくとも1個の排気可能な出口である請求項1に記載の反応容器。

(3) 前記試薬固定部分よりも上流側に、少なくとも1個の試薬付着部分を有する請求項1または2に記載の反応容器。

(4) 前記試薬付着部分のうちの少なくとも1個が前記流体入口よりも上流側にある請求項3

に記載の反応容器。

(5) 前記試薬固定部分および/または前記試薬付着部分が凹部および/または小突起集合体である請求項1~4のいずれかに記載の反応容器。

(6) 前記通路の流体入口付近に少なくとも1個の液体滞留部を有する請求項1~5のいずれかに記載の反応容器。

(7) 前記通路の前記試薬固定部分よりも下流側に、液体滞留部を有する請求項1~6のいずれかに記載の反応容器。

(8) 前記液体滞留部に吸水性材料を収納してなる請求項7に記載の反応容器。

(9) 前記吸水性材料が脱脂綿である請求項8に記載の反応容器。

(10) 前記吸水性材料収納部付近に前記排気可能な出口を有する請求項8または9に記載の反応容器。

(11) 前記試薬固定部分と前記吸水性材料との間の通路の少なくとも一部が親水性条体から

## 特開平3-223674(2)

なる請求項8～10のいずれかに記載の反応容器。

(12) 前記親水性条体の少なくとも一部が前記通路に形成された中空室内に度張されてなる請求項11に記載の反応容器。

(13) 前記通路が水平である請求項1～12のいずれかに記載の反応容器。

(14) 前記通路が毛管部分を有する請求項1～13のいずれかに記載の反応容器。

(15) 前記通路の一部に狭輪部を有する請求項1～14のいずれかに記載の反応容器。

(16) 前記通路に、試薬固定部分を有する試薬固定領域および／または試薬付着部分を有する試薬付着領域が形成され、該試薬固定領域および／または試薬付着領域の断面積が、通路液体滞留部および液体貯留部を除く他の部分の断面積より大きい請求項1～15のいずれかに記載の反応容器。

(17) 前記構体が、前記通路を少なくとも1個に有する複数の割型で構成される請求項1～

16のいずれかに記載の反応容器。

(18) 前記構体が、前記通路を有する割型と、通路を有さない蓋体で構成される請求項17に記載の反応容器。

(19) 前記蓋体が、前記通路を有する割型と密着している請求項18に記載の反応容器。

(20) 前記蓋体と前記通路を有する割型との間に空間を有する請求項18に記載の反応容器。

(21) 前記構体が3個以上の割型または蓋体および割型で構成され、隣接する割型間に形成されている通路は、隣接する他の通路と連通している請求項1～20のいずれかに記載の反応容器。

(22) 前記少なくとも1個の流体入口のうち、最上流よりも下流側にある流体入口から流入する液体は、最上流の流体入口から流入する液体と実質的に同方向に走行するよう構成された請求項1～21のいずれかに記載の反応容器。

(23) 前記構体の少なくとも一部が親水性材料で構成される請求項1～22のいずれかに記載の反応容器。

(24) 前記通路の液体滞留部を含む上流通路部分と、液体貯留部を含む下流通路部分が、構体の重心の互いに反対側に存在する反応容器であって、前記流体入口から液体滞留部に流入した液体が、構体内の通路を経て所定の反応を行ないつつ液体貯留部に向かって流れ、所定の反応が実質的に終了した時に、流入した液体の移動の結果として、構体の液体貯留部の存在する側が下降するよう構成した請求項7～23のいずれかに記載の反応容器。

(25) 前記構体は、請求項24に記載の液体移動の結果、液体貯留部を含む下流通路部分が存在する側が下降するような位置において、揺動手段を有する請求項24に記載の反応容器。

(26) 前記揺動手段は、前記構体の底部に設けられた脚または平面あるいは曲面を有する台

である請求項25に記載の反応容器。

(27) 請求項1～26のいずれかに記載の反応ユニットが複数個並列されてなることを特徴とする反応容器。

## 3. 発明の詳細な説明

## &lt;産業上の利用分野&gt;

本発明は、酵素免疫測定法、DNA検出法等による生体内微量物質の測定を簡便に実施するための反応容器に関する。

## &lt;従来の技術&gt;

生体内微量物質の測定は、各種疾患の診断および治療効果の判定等を目的として頻りに実施されており、目的に応じ、手軽に操作を行うことができる簡易測定法や、高感度で測定精度が高い測定方法が次々と開発されている。なかでも、簡易測定法は、非常に便利な方法であり、測定機器や反応装置等を用わずに手軽に実

## 特開平3-223674(3)

施できることから、定性的もしくは半定量的測定のみで十分診断を下すことができる用途で広く用いられている。例えば、尿中ブドウ糖の測定やその他の生化学的な検査、妊娠診断等に用いられているが、さらに、核酸ハイブリダイゼーション法によってDNAを検出することによる病原ウイルスの検出や、その他の反応にも応用が広まりつつある。

ところで、現在、免疫反応（抗原抗体反応）を測定原理として利用している簡易測定法としては、担体として赤血球またはラテックスを用いる凝集反応もしくは凝集阻止反応（以下、両者を合わせて凝集反応という）、および、標識剤として酵素を用いる酵素免疫測定法（EIA）等がある。

凝集反応のうち、担体として、赤血球やその他の類似合成物を用い、底面が球面状となったアンフル内で反応を行なわせ、その球面上に形成される沈降リングもしくは沈降スポットの大きさまたはそれらの有無によって判定を行なう

方法（凝集沈降反応法）は、操作が簡便であり、測定感度は比較的高いが、その結果の判定が赤血球またはその他の類似合成物の沈降に依存しているため、結果が得られるまでに長時間を要する。一方、担体としてラテックスを用い、スライド上で攪拌しながら、その凝集像の凝集程度から判定を行う方法（ラテックス凝集反応法）は、感度はやや低いが、操作は簡便で、短時間で結果が得られる。そのため、ラテックス凝集反応法は、妊娠診断等、比較的に高感度を必要としない用途に、現在、最も広く利用されている。しかし、この方法は、結果の判定に熟練が必要であるため、正確な判定を行なえるのは、主として病院・診療所等の医療機関の医師や検査技師に限られている。

簡易測定法としてのEIAは、測定感度はこの方法に比して高いが、その高感度を得るには、比較的長時間の反応が必要である場合がある。さらに、B/F分離操作（抗原抗体反応において、抗原と抗体が結合して生じた結合型

（Bound: B）と結合していない遊離型（Free: F）とを物理的に分離すること）が煩雑であり、しかも、このB/F分離が正確になされないと、次の工程である酵素反応において、非特異的な反応が生じ、結果の判定を誤らせる等の欠点を有している。

上記のように、凝集反応法に基づく簡易測定法は、物質の存在の有無を検知することは可能であっても、物質の存在量の測定、すなわち、定量的測定には不適當である。一方、EIAは、測定に長時間を要し、B/F分離操作が煩雑であるという欠点を有するが、測定の結果を反応液の色の变化、すなわち発色等の有無によって定性的に判定、あるいは発色等の程度によって定量的に測定する方法であるので、定性的判定はもとより、定量的測定が可能であり、しかも、結果の判定を、誰でも容易に、かつ正確に行うことができるという利点を有している。そこで、このような利点を有するEIAについて、反応時間を短縮したり、B/F分離

操作等を簡便化するための研究が数多くなされているが、未だ、満足すべき測定法が実用に供されていないのが実情である。

また、最近、簡易測定法が適用されつつあるが、核酸ハイブリダイゼーション法を利用して特定のDNAまたはRNA（以下、両者を合わせてDNA等と略す）を検出する検査は、その反応様式が、DNA等が特定のDNA等と選択的に結合する性質を利用する点で、抗原抗体反応を用いる免疫学的測定方法、とりわけEIAに類似している。したがって、EIAと同様な工程が必要であり、従来の測定法では、反応に長時間を要する、B/F分離操作が煩雑である等、EIAと同様の解決すべき課題がある。

そこで、この課題を解決するための一手段として、特開昭63-20063号公報および特願昭62-215992号で、皿状の容器が提案されている。

実際、この容器を使用することにより、定性

## 特開平3-223674(4)

反応用 E I A の操作は著しく簡便化された。

しかし、この容器を用いても、定量性に優れるという E I A の利点は、最大限には活かされない。

さらに、E I A の実施には、例えば、試料分注、洗浄液添加、酵素標識抗体溶液の添加、発色剤あるいは酵素基質の添加等の複数の操作が必要であり、これらの複数の操作を実施しなければならないという煩雑さと、操作回数多さに起因する測定までに要する時間の短縮に関しては、何ら解決がなされていない。

すなわち、定量的測定が可能な測定法の簡便化にあたり、課題となるのは、B/F分離操作の簡便化と、試料および試薬の添加操作の簡便化であるが、前記の皿状の容器を用いても、これらの課題については未だ改良の余地が残されている。

## &lt;課題を解決するための手段&gt;

本発明は、E I A や核酸ハイブリダイゼーション法において、抗原抗体反応またはハイブリダイゼーション反応、B/F分離操作、酵素反応、結果の判定等の一連の操作を、比較的短時間に連続して実施できる反応容器に関する。

本発明の反応容器は、通常の測定は、特別の機器を必要とせず実施可能である。しかも、多数の検体を連続処理する場合や、定量的測定の目的で、自動測定機器に適合させることも可能である。

そして、本発明の反応容器は、上記の特徴を具現化したものであって、構体内に、少なくとも1個の流体入口を有する通路を有し、該通路の途中であって全ての流体入口よりも下流側に少なくとも1個の試薬固定部分を有し、かつ、通路と連通する排気機構を有する反応ユニットを少なくとも1個有する構成となっている。

以下に、本発明を詳細に説明する。

## &lt;発明が解決しようとする課題&gt;

上記のように、高感度で、操作が簡便で、しかも正確な測定を行いうる簡易測定法は、未だ開発されていない。

本発明は、このような実情に鑑みてなされたものであり、感度の高い測定を、操作、特にB/F分離操作を正確にしかも簡便に行うことができ、しかも、試料および試薬の添加操作を簡便に行うことができる反応容器の提供を目的とする。

また、本発明は、様々な反応、例えばE I A や核酸ハイブリダイゼーションの機構を利用した検出方法に広く適用可能な容器の提供を目的とする。

さらに、本発明は、簡便な操作で多項目同時測定を行うことのできる反応容器の提供を目的とする。

本発明の反応容器は、少なくとも1個の反応ユニットを有する。従って、まず、1個の反応ユニットを有する反応容器の構成を、図面に基づいて説明する。本発明は、その態様が多岐にわたるため、まず図面についての説明を行なう。

第1a図は、本発明の一実施例の斜視図、第1b図は、その通路部分の断面図である。

第2a図は、本発明の一実施例の斜視図、第2b図および第2c図は、そのA-A線およびB-B線における矢視図である。

第3a図、第3b図および第3c図は、本発明の一実施例の各部品の平面図、第3d図は、その側面図、第3e図および第3f図は、そのC-C線およびD-D線における矢視図である。

第4図は、本発明の一実施例の斜視図である。

第5図は、本発明の一実施例の平面図である。

## 特開平3-223674(5)

第6a図および第6b図は、本発明の一実施例の各部品の平面図、第6c図はその側面図である。

第7a図および第7b図は、本発明の一実施例の各部品の平面図、第7c図および第7d図はその側面図である。

第8a図、第8b図および第8c図は、本発明の一実施例の各部品の平面図、第8d図はその側面図、第8e図は第8b図中のA部分の拡大縦断面図である。

第9a図および第9b図は、本発明の一実施例の各部品の平面図、第9c図はそのX-X線における断面図である。

第10図、第11図および第12図は、各々本発明の一実施例の平面図である。

ここで説明する本発明の反応容器の一反応ユニットは、その構成要件として、構体、構体内の少なくとも1個の流体入口を有する通路、該通路の途中であって全ての流体入口よりも下流側に位置する少なくとも1個の試薬固定部分、

る通路を少なくとも1個に有する複数の割型で構成されることが好ましい。あるいは、後述する通路を開放状態で有する構体と、該通路の所要部のみを開口するようにした構体である蓋体で構成されることが好ましい。

また、第6c図、第7c図および第8d図に示すような構成とすると、反応が実質的に終了した時に、同図中矢印で示した方向に反応容器が傾き、反応の終了、換言すれば測定あるいは判定が可能となったことを知らせるので、このような構成も好ましい。具体的には、反応容器は、第7c図の状態から、反応が終了すると第7d図の状態となる。

構体の材質としては、ガラス、エポキシ樹脂、ポリアクリル樹脂、ポリエステル樹脂、ポリスチレン樹脂、ポリ塩化ビニル樹脂等の各種プラスチック等があげられるが、これらはいずれも、親水性材料、あるいはフロスト処理等の各種親水化処理が可能なプラスチックである。

前記通路と連通する排気機構を有する。

構体2は、第1a図に示すように、一部材で構成されていてもよいし、第2a図および第4図に示すように、2個の構体の割型4、5で構成されていてもよいし、さらには、第3d図、第3e図および第3f図に示すように、構体の蓋体3および割型4、5で、あるいはそれ以上の多数の割型で構成されていてもよい。

さらには、第6c図に示すように、構体の蓋体3および割型4と、同じく構体である脚9aで構成されていてもよいし、第7c図に示すように、割型4と、割型4を覆って蓋の役目をはたすシート8製の蓋体3とで構成され、割型4の下側が船底型となっていてよい。あるいは、第8d図に示すように、構体の蓋体3、割型4、5と、同じく構体である台9bで構成されていてもよい。

本発明の反応容器の製造工程において、後述する通路内の試薬固定部分および試薬付着部分の作製の容易さを考慮すると、構体は、後述す

また、構体の一部、例えば蓋体がシートの場合、シートの材質としては、構体の材質として上記したもののがあげられ、他に、アルミニウム等の金属等があげられる。シートは、構体の他の部分に熱圧着可能であるか、あるいはシート的一方の面に接着剤が積層されているとよい。

構体(含シート)の色は、特に限定されないが、反応結果が色で示される場合は、透明、あるいは上方のシート又は割型が透明で、下方の割型が白であることが好ましく、蛍光による場合は、透明が好ましい。

構体内または構体を構成する割型には、通路が形成される。この通路を、各種検体(例えば尿、血清等)、洗浄液、反応用溶液等の液体および空気等が通る。そして、この通路は、少なくとも1個の流体入口を有し、例えば排気可能な出口等の排気機構に通じる。

流体入口10(11)は、第1a図、第2a図、第4図、第5図、第6b図、第8a図、第

## 特開平3-223674(6)

9 a 図、第 10 図および第 12 図に示すように、一つだけでもよいし、第 3 a 図および第 3 b 図や第 7 a 図に示すように、二つ、あるいはそれ以上あってもよい。

流体入口が複数ある場合、例えば機体と反応用溶液等、複数の液体を同時にまたは所定の順序で添加することも可能である。

尚、流体入口が複数ある場合は、第 3 a 図、第 3 b 図、第 3 c 図、第 3 d 図、第 3 e 図および第 3 f 図に示す例のように、流体入口 10、11 の配置位置を工夫することにより、最上流よりも下流側にある流体入口 10 から流入する液体が、最上流の流体入口 11 から流入する液体と実質的に同方向に走行するよう構成することが好ましい。

また、流体入口のうちのひとつは、最上流側に設けられる場合が多いが、例えば第 9 b 図に示す例のように、流体入口 10 を通路 50 の中間部分に設けてもよい。第 9 b 図に示す例の場合、流体入口 10 よりも上流側（同図中右

側）に流入した液体も、最終的には下流に向かって流れる。

通路に通じる排気機構の一例は、通路の一部に設けられた排気可能な出口である。

具体例について述べると、第 1 a 図、第 2 a 図、第 4 図、第 5 図および第 10 図に示すように、通路の一端が、機体等の添加された液体や空気等の気体が流出可能な、構体の側面に開口した開放端となり、その開放端が出口 20 となっているもの、第 3 c 図に示すように、通路の一端が構体の下方にむかって開口し、出口 20 となっているもの等がある。

あるいは、第 6 a 図および第 6 b 図、第 7 a 図および第 7 b 図、または第 8 a 図に示すように、構体の上方、下方あるいは側面にむかって開口する出口を 2ヶ所（出口 20 および出口 21）有するもの等がある。ただし、第 6 a 図および第 6 b 図、第 7 a 図および第 7 b 図、または第 8 a 図、第 8 b 図および第 8 c 図に分解した各構成部品の平面図を示す例のように、

後述する液体貯留部 90 を有し、液体貯留部 90 の少なくとも一部に吸水性材料 81 が収納されている構成の場合には、出口 20 から液体が流出することは殆どなく、出口 20 は排気のために供される。また、出口 21 は、後述する試薬付着部分 40 を有する試薬付着領域 T に液体を流入させるために設けたものであり、やはり排気口となる。

同じく出口が複数個ある例であるが、第 11 図に示す例は、後述する通路の下流側が枝分れして、その枝分れした通路（毛管部分 52、53、54）それぞれの末端が出口 20、21、22 となっている構成である。

このように、出口は、機体等の添加された液体が排出されるように設計することもできるし、添加された液体は排出されずに通路内に留まり、通路内にあった気体のみが排出されるように設計することもできる。

本発明の反応容器を、通路に通じる排気機構を有する構成とするために、通路に出口を設け

ることは、必ずしも必要ではない。

例えば第 9 a 図、第 9 b 図および第 9 c 図に示す例のように、通路を有する割型 4 の上面の四周部のみが蓋体 3 と接着され、通路部分の上面は、空間を介して蓋体 3 で遮断された構成としてもよい。このような構成とすると、流体入口 10 から液体が添加された際に、通路内にあった気体（空気）は、蓋体 3 と割型 4 との間の空間に移動するので、通路に特に出口は設けていないが、液体は、通路内を流れることができる。

通路自体の構成は、以下に説明するように、様々なバリエーションが可能である。

まず、通路の方向性であるが、例えば、第 1 a 図および第 1 b 図に示すように、構体 2 に対して通路 50 が水平であってもよいし、第 3 e 図および第 3 f 図に示すように、構体 2 に対して水平の部分と垂直の部分とを有していてもよい。あるいは、図示しないが、流体入口から出口または液体貯留部にむかって傾斜して

## 特開平3-223674 (7)

いてもよい。

通路の平面形状は、全く任意でよく、例えば第1a図および第1b図に示すように、直線状であってもよいし、第2a図、第4図、あるいは第3b図および第3c図に示すように、曲線状であってもよい。さらには、第6b図、第7b図、第8b図、第9b図および第11図に示すように、コーナーを有する、および/または枝分れしているといったような通路でもよい。

なお、通路は、一般的には、第13a図にその平面図が示されているような平坦な側面(壁面)を有するものが考えられるが、これに限定されず、例えば第13b図や第13c図にその平面図が示されているような、側面(壁面)に突起部63を有するもの等であってもよい。

また、通路50の断面の形状は、第14a図に示すU字形、第14b図に示す四角形、第14c図に示す凸形、第14d図に示すV字形、第14e図に示すW字形の他、円形、楕円

形等、どのようなであってもよいが、第14c図の例では凸部が、第14d図および第14e図の例では先端鋭部が毛管部分51、52となっているため、毛管現象も手伝って、添加された液体の移動がスムーズとなる。あるいは、第14f図に示すように、通路は、ここを流れる液体を支持できる幅の空間として形成されていてもよい。

なお、本発明において、「通路の毛管部分」とは、第14c図、第14d図および第14e図の場合のように、通路の断面形状における一部分を指すとは限らず、通路の平面形状における一部分を指す場合もある。ともかく、通路において、毛管現象が生じるような形状の部分は全て、毛管部分と呼ぶ。

通路の断面積は、第1a図および第1b図に示すように、全長にわたって同じ大きさ、すなわち通路50の全てが毛管部分51であってもよいし、第2a図、第4図、第3b図および第3c図に示すように、毛管部分51、52、

53、54の他に、狹隘部60、61や液体滞留部70、71等を有するものであってもよい。さらには、第5図、第6b図、第7b図および第12図に示すように、毛管部分51、52、53、54、55の他に、液体滞留部70、試薬付着部分を有する試薬付着領域S、T、試薬固定部分を有する試薬固定領域X、液体貯留部90等を有するものであってもよい。また、第7b図および第8b図に示すように、通路の一部が親水性条体59で代替されていてもよい。

ところで、本発明において、液体滞留部とは、流体入口付近に設けられ、検体等の液体を滞留させて、その添加を行いやすくする役割になる。

このような液体滞留部の大きさは、添加される液体量や通路全体の容積によって定まるが、特に、通路が後述する液体貯留部を有し、添加された液体が構体内に保持されるような反応容器では、1回に添加される液体量を液体滞留部

の容積とした場合、(液体滞留部の容積×液体添加回数<液体貯留部の容積)の関係が成立する大きさとする。

なお、液体滞留部の容積を大きくしたい場合には、第9c図に示すように、液体滞留部70を通路を有する割型4の表面よりも突出させる等の手段を取ればよい。

また、狹隘部は、通路内を流れる液体の流入速度を調節する役割と、液体の逆流を防ぐ役割になる。

従って、第2a図、第4図、あるいは第3a図、第3b図および第3c図に分解した各構成部品の平面図を示す例のように、流体入口10、11付近に液体滞留部70、71を有し、その近傍に狹隘部60、61を有すると、添加される液体の流入速度を調節しやすい。

また、第3a図、第3b図および第3c図に分解した各構成部品の平面図を示す例においては、狹隘部60は、最上流の流入入口11から流入した液体が、最上流よりも下流側にある流

## 特開平3-223674 (8)

体入口10に連通する液体滞留部70へ流入するのを防ぐ役割もはたしている。

液体貯留部とは、反応終了後の検体、反応用溶液、洗浄液等を貯留する部分である。従って、液体貯留部は、後述する試薬固定部分よりも下流側に形成される。

第4図に示される例では、毛管部分52の中の試薬固定部分30よりも下流側が液体貯留部90である。

第5図に示される例では、やはり試薬固定部分30よりも下流側が液体貯留部90であるが、この例では、多くの液体を貯留させるために、液体貯留部90の一部の断面積を大きくして大容積とし、その部分を吸水性材料収納領域80とし、そこに吸水性材料81を収納している。また、第6b図、第7b図、第8b図および第9b図に示される例も、液体貯留部90の一部または全部が吸水性材料81を収納している吸水性材料収納領域80となっている。

吸水性材料とは、ろ紙、吸水ポリマーと称さ

れている高分子材料、綿等の天然繊維等をいい、本発明においては、液体貯留部の一部あるいは全体に収納されて用いられる。

尚、吸水ポリマーとしては、ポリビニルアルコールとアクリル酸ナトリウムとの共重合体、セルロースなどがあげられる。そして、自身の体積があまり大きくないものが好ましい。

吸水性材料は、固定せずに収納するだけでもよいが、固定する場合は、接着、封入等の公知の方法で行なえばよい。

また、吸水性材料の使用量は、添加される液体量に応じ、全ての液体を吸収できる量とする。

なお、吸水性材料は、一般的に通気性を有するが、吸収、保持する液体量が増すにつれ、通気性が低下することもあるので、本発明の反応容器であって、吸水性材料収納領域を有し、通路の上面が蓋体3で密閉されているものは、第6b図および第7b図に示すように、出口20を吸水性材料収納領域80の極付近上流側に設

け、吸水性材料が液体を吸収、保持した後も排気可能とすることが好ましい。

液体貯留部を有すると、出口を有する構成の場合であっても、出口は排気のためにのみ用いられ、順次添加される検体等の液体が反応容器外に流出しないうちに全反応を終了できるので、特に、検体が感染性あるいは汚染性を有する物質を含有しているおそれがある場合等、その廃棄処理を行ないやすくよい。また、液体貯留部の一部または全部に吸水性材料が収納されていると、これらの吸水性材料は、検体等の液体を吸収、保持するので、添加された検体等の液体が確実に容器外に流出せず、かつ吸水性材料が液体を吸引し、流体入口から添加された液体の通路内の移動を円滑とするので、さらに好ましい。

ところで、本発明の反応容器の通路が、毛管部分あるいは毛管とはなっていないが相対的に断面積の小さい通路部分と、それらに比べて断面積が大きく大容積となっている部分（以下、

大容積部という。尚、大容積部は、試薬付着領域S、Tや試薬固定領域X等として機能する。）とから構成されている場合、毛管部分等から大容積部への遷移部分は、第6b図および第7b図に示すように、所定の鋭角で広がる構成とすることが好ましい。これは、毛管部分等を流れてきた液体がひき続き大容積部を濡らして流れていくために重要な因子である。第8b図に示す例のように、前記遷移部分が鈍角で広がる場合は、大容積部に傾斜をつけ（毛管部分から大容積部へ遷移する側を高く、他方を低くする）、付加的重力の作用も伴って、毛管部分等を流れてきた液体がひき続き大容積部を濡らして流れるように構成することが好ましい。

また、先に述べた通路の一部を親水性条体59で代替した例（第7b図、第8b図）において、親水性条体59は、通路内を流れる液体の流速を、任意に調整、制御する役割をになう。



## 特開平3-223674(9)

すなわち、反応容器において、容器内を流れる液体の流速は、反応の精度と密接な係わりがある。これを、免疫反応(EIA法)を行なわせる場合について述べると、流速を、

①免疫反応を完全に行なわしめるのに適した速度、

②B/F分離を完全に行なわしめるのに適した速度、

③基質が発色体となり、該発色体が所定の位置に堅固に沈着するのに適した速度、

のうち、最も遅い速度に制御すると、反応の精度が高くなる。

そして、流速の制御は、構体の材質の選択や通路の断面積の調整等によるのであるが、通路の断面積の調整は、加工上の、すなわち技術的困難さがある場合があり、コストアップにつながる場合がある。そのような場合、通路の一部を親水性条体に代替すると、親水性条体の太さを選択するのみで、容易に精密に流速制御を行ない得る。特に、親水性条体で代替する部

位を液体貯留部の直前とすれば、反応の全工程の速度を制御できる。

親水性条体に代替する部分は、構体自体には、通路を形成してもしなくてもよいが、形成する場合であっても、構体自体に形成する通路はラフ加工でよいので、加工費の点および技術的な点で問題はない。

尚、第8b図および第8e図に示す例のように、親水性条体59を構体に形成した通路内に展張する場合は、親水性条体59の少なくとも一部分が通路に形成された中空室58内に展張されるようにする。第8e図について説明すると、中空室58部分以外では、親水性条体59があっても、通路の断面積は毛管部分55の断面積となってしまうが、中空室58部分では、毛管部分55よりも断面積の小さい親水性条体59のみが通路となるので、流速を完全に制御でき、反応に必要なかつ充分な時間を確保できる。

親水性条体の材質としては、糸、紙、布等が

例示でき、また、その断面積は、所要反応時間によって適宜選択されるが、例えば免疫反応の場合には、親水性条体の断面形状が円の場合、直径0.2~1mm程度が好ましい。

以上、本発明の反応容器の通路について説明したが、次に、通路の形成方法について述べる。

第1a図に示す例のように、構体2の内部に通路50がある場合は、構体2を切削する等の方法によって形成すればよい。また、例えば第2a図に示す例のように、構体2が割型4、5から構成される場合は、通路を有する割型4、5各々に対応する型を作り、その型に樹脂組成物を入れ、硬化させ、型から抜くことで製造することができる。あるいは、第7c図に示す例のように、構体2が蓋体3と割型4から構成される場合は、蓋体3および通路を有する割型4を、同様に型成形することができる。もちろん、割型、あるいは蓋体と割型となっている場合も、切削等の方法によって通路を形成してもよい。

そして、割型同士、あるいは蓋体と割型とは、適当な接着剤で接着して構体とする。

ところで、構体2が割型4、5から構成され

## 特開平3-223674 (10)

る場合、あるいは蓋体3と割型4、5で構成される場合、蓋体3、割型4、5は、互いに、通路50以外の平面全てで接触している必要はない。

第15図は、隔壁で画された通路を有する本発明の一実施例の断面図である。第15図に示すように、割型4に形成された通路50を画する隔壁67の部分だけが、接着剤65によって蓋体3と接着されていてもよい。

尚、接着剤65を十分、かつ均一に塗布するために、通路50を形成するための隔壁67の幅wは小さいことが好ましい。

また、第9a図、第9b図および第9c図に示す例は、その上面が直接的には閉鎖されていない通路を有する本発明の一実施例である。

第9c図に示すように、蓋体3は、割型4の四周部のみで接着されていてもよい。

さらに、他の方法としては、平板状の割型間に、接着剤自体を隔壁とすることによって通路を形成する方法がある。

第16a図および第16b図は、平板状の蓋体3と割型4との間に、接着剤65自体を隔壁とすることによって通路を形成する方法を説明するための図である。尚、第16a図は分解斜視図、第16b図は部分断面図である。

この方法では、割型4に、通路50形成用隔壁となるように、通路50の形状に対応して接着剤65を塗布し、次に、通路50の高さと同じ厚さのスペーサー（図示せず）を蓋体3と割型4との間にはさんで蓋体3と割型4を圧着し、接着剤65を硬化させる。それにより、硬化した接着剤65自体が隔壁となって通路50が画された反応容器ができる。

蓋体と割型、あるいは割型同士の接着に用いる接着剤は、適当な粘度を有し、硬化時に収縮しない室温硬化型接着剤が好ましい。そして、粘度は、接着面積が大きい場合は低粘度のものが好ましく、第16a図および第16b図に示す例のように、接着剤自体によって通路を形

成する場合は、盛り上り接着が可能な接着剤が好ましい。接着剤の一例をあげると、エポキシ系接着剤、酢酸ビニル系接着剤、合成ゴム系接着剤、シアノアクリレート系接着剤等があげられる。

尚、割型同士の接着あるいは接着剤による通路の形成は、本発明の反応容器の製造工程における最終工程とすることが好ましい。

ところで、構体の材質が親水性である場合はよいが、そうでない場合は、少なくとも通路の一部は、親水化させるとよい。これにより、添加された液体が通路内を濡らし、円滑に通路内に流入するようになる。

通路を親水化させる方法は、特に限定されないが、通路部分の構体材料として、表面に親水性基が導入されたものを用いる方法、プラスト処理、プラズマ処理、レーザー処理、フロスト処理等の粗面化処理の利用、あるいは、陽イオン性界面活性剤等の帯電防止剤や蛋白質等の親水性物質を塗布する方法等が例示される。な

お、親水化のためには、構体材料が（メタ）アクリル樹脂であれば、メチル（メタ）アクリレートと硫酸（メタ）アクリレートとの共重合体が、また、スチレン系樹脂であれば、同じくスチレン系の共重合体が好適に使用される。

また、構体が、3個以上の部品（割型、あるいは蓋体および割型）で構成され、その割型間に通路が形成される場合は、例えば第3a図、第3b図、第3c図、第3d図、第3e図および第3f図に示す例のように、割型4に形成されている通路の毛管部分52は、通路の連通部56で、割型5に形成されている通路の毛管部分54の通路の連通部57に連通するように構成する。これにより、蓋体3、割型4、5で構成される構体の面積が小さくても、長い通路を有する反応容器が得られる。

さらに、第7a図、第7b図、第7c図および第7d図や、第8a図、第8b図、第8c図、第8d図および第8e図に示す例のように、通路の一部が親水性条体59で代替されて

## 特開平3-223674(11)

いる場合、親水性条体59の末端あるいは屈曲点における固定は、接着剤等を用い、通常の方法で行なえばよい。

本発明の反応容器の一反応ユニットは、以上説明してきたような構成の通路内に、少なくとも1個の試薬固定部分を有するものである。

試薬固定部分とは、通路内に有り、測定しようとする物質に特異的に結合する物質（試薬）が固定されている部分であり、ここで、本発明の反応容器内における最終の反応が行われるので、この部分を観察する（定性反応）ことにより、あるいは計測する（定量反応）ことにより、検体中の被測定物質の有無あるいは被測定物質量を検出、測定することができる。

試薬固定部分に固定される試薬は、測定が免疫反応による場合は、抗体、抗原またはハプテン、あるいはそれらの誘導体であり、核酸ハイブリダイゼーション反応による場合は、DNAまたはRNAである。その他、レクチン、受容体、リガンド等、被測定物質と特異的に結合

する物質であれば、固定用試薬として用いることができる。

試薬固定部分は、通路内で、かつ全ての流体入口よりも下流側にある。ただし、試薬固定部分よりも下流側の通路の長さは、特に限定されない。そして、添加された液体を排出する構成とする場合は、試薬固定部分を最下流側に設け、添加された液体が検体から排出されない構成（通路の試薬固定部分よりも下流側が液体貯留部である構成）とする場合は、試薬固定部分を上流側に設けることが好ましい。

試薬固定部分の形状は、特に限定されず、四角形、円形、楕円形、六角形等適宜の形状とすることができる。

ところで、試薬固定部分は、前記のように、検体中の被測定物質の有無あるいは被測定物質量を検出、測定する場であるので、第3a図、第3b図および第3c図に示す例のように、試薬固定部分30に通路が重畳しない構成となっていると、特に肉眼判定や光学器械による測定

を行なう場合に、精度が高くなる。

また、同じく第3a図、第3b図および第3c図に示す例のように、蓋体3および試薬固定部分30を有さない割型4の試薬固定部分30に対応する部分6、7が無色透明の材料で構成されていると、特に色によって判定や測定を行なう場合に、測定精度が高くなる。

さらに、試薬固定部分30を有する割型5も無色透明の材料で構成されていると、特に透過光によって測定を行なう場合に、測定精度が高くなる。

ところで、試薬固定部分は、通路に前記固定用試薬を固定することで形成できるが、通路の一部を大容積部とし、該大容積部を試薬固定領域とし、該試薬固定領域内に1個あるいは複数の試薬固定部分を設けてもよい。また、試薬固定領域も1個に限定されず、複数個あってもよい。

試薬固定部分が複数ある場合は、試薬固定部分の配置パターンを工夫することにより、検査

結果の判定を、より容易に、より高精度にすることができる。あるいは、多項目同時測定が可能となる。

ここで、多数の試薬固定部分を有する場合の試薬固定部分の配置パターンの例を、図面に基づき説明する。

第12図は、1個の試薬固定領域Xに2個の試薬固定部分30、31を有する例、第7b図は、1個の試薬固定領域Xに3個の試薬固定部分30、31、32を有する例、第8b図および第10図は、通路の毛管部分に、2個または3個の試薬固定部分30、31、32を有する例、また、第11図は、分岐した毛管部分52、53、54の各々に、各1個の試薬固定部分30、31、32を有する例である。

第7b図、第8b図、第10図および第12図に示す例においては、試薬固定部分に、互いに干渉しない試薬2種または3種が固定されている。即ち、例えば検体中の被測定物質を免疫反応によって測定するに際して用いる反応容

器であれば、互いに交差反応性を有しない複数の抗体、抗原あるいはハプテンが固定されている。

また、第11図に示す例においては、固定される試薬は、互いに干渉するものであってもよい。

このように、複数の試薬を固定する場合は、例えば1種を検出用、他を対照用試薬としてもよいし、多項目同時測定を行なうために、異なる種類の検出用試薬を固定してもよい。もちろん、1種の試薬を複数箇所に固定してもよい。

さらに、第17a図、第17b図および第17c図に、試薬固定領域X内の複数の試薬固定部分の配置パターンの例を示した。

第17a図に示す例は、試薬固定部分を扇形に設けたものであり、例えば、要の位置（同図中30）には検出用試薬を、弧の位置（同図中31）には標準品（希釈系列とするとよい）を固定する。試薬固定領域X内の試薬固定部分

応が起こり、「-」状に読める。従って、結果の判定が容易となる。

尚、前記した第8b図に示す例も、同図中で横となっている試薬固定部分31には、検体中に常に存在する物質であって、被測定物質とは交差反応しない物質と結合または反応する試薬を、同図中で縦となっている試薬固定部分30には、被測定物質と選択的に結合または反応する試薬を固定すれば、第17b図に示す例と同様に、検体中に被測定物質が存在すると「+」状、存在しないと「-」状に読める。

第17c図に示す例は、第17b図に示されると同様の5個の試薬固定部分（同図中30および31）の他に、4個の試薬固定部分（同図中32）を設けたものである。第17c図中、32で示された試薬固定部分で結合または反応が起こり、それに基づく発色等がみられる場合は、洗浄操作が不十分である等の操作の誤りがあることを示すように、32で示された試薬固定部分に適切な試薬を固定するとよい。

### 特開平3-223674 (12)

の配置パターンがこのような構成の容器を使用し、検体中の被測定物質と標準品希釈系列とを同時に測定すると、例えば発色の程度により、被測定物質量を標準品と比較できるので、より正確な半定量を実施することができる。

第17b図に示す例は、試薬固定部分を「+」形に配置したものである。この例では、例えば、横に並んだ3個の試薬固定部分（同図中31）には、検体中に常に存在する物質であって、被測定物質とは交差反応しない物質と結合または反応する試薬を、他の2個の試薬固定部分（同図中30）には、被測定物質と選択的に結合または反応する試薬を固定する。このような配置とすると、被測定物質が検体中に存在する場合は、全て（5個）の試薬固定部分で結合または反応が起こり、その結合または反応を発色等によって検出すると、「+」状に読め、検体中に被測定物質が存在しない場合には、第17b図において、31で示される3個の試薬固定部分のみで結合または反

このように、複数の試薬固定部分を有する構成とすると、多項目同時測定や、検体中の被測定物質と対照物質との同時測定が可能である。

尚、通路の毛管部分や試薬固定領域への試薬の固定は、公知の方法で行えばよく、通常の取扱いで試薬が離脱しないように固定できる方法であれば、その固定は、化学的結合によるものであっても、物理的吸着によるものであってもよい。一例をあげると、加温して吸着させる方法がある。

また、試薬固定領域を設ける場合の試薬固定領域の大きさは、通路の他の部分の大きさとも関係するが、例えばその平面形状が四角形の場合について述べると、一辺が10～15mm程度が好ましい。

以上の構成に加え、本発明の反応容器の通路内であって、試薬固定部分よりも上流に試薬付着部分があると、反応容器使用時の反応用溶液等の分注回数を低減することができ、操作がさ

## 特開平3-223674(13)

らに簡便となる。

ここで、試薬付着部分とは、反応に係わる試薬が付着している部分であり、その付着力は、試薬付着部分を液体が流れることによって、付着している試薬が離脱可能な程度でなければならない。従って、例えば、試薬の水溶液を通路内の適当な場所に付与し、それを凍結乾燥するというような方法で試薬を付着させ、試薬付着部分とするとよい。

尚、試薬付着部分は、通路内であって、試薬固定部分よりも上流側にあればよいので、例えば第3a図、第3b図、第3c図、第3d図、第3e図および第3f図に示す例は、試薬付着部分40が毛管部分52の途中にあるが、この例において、液体滞留部71内に試薬付着部分があってもよい。

また、第9b図に示す例のように、流体入口10よりも上流側の通路内に、試薬付着部分40を設けてもよい。このような構成とすると、試薬付着部分40に付着せられた試薬は、

あるいは、標識剤が酵素である場合の酵素の基質等があげられる。

また、試薬付着領域が設けられ、その断面積が通路の毛管部分の断面積よりも大であると、反応が十分行なわれ得るので好ましい。

ところで、前記試薬固定部分、または前記試薬付着部分は、通路の毛管部分や試薬固定領域または試薬付着領域に所定の試薬を固定または付着させるだけで形成されるが、通路の毛管部分や試薬固定領域および／または試薬付着領域に凹部および／または小突起集合体を形成し、凹部あるいは小突起に試薬を固定または付着させて試薬固定部分または試薬付着部分とすると、検体中の被測定物質と試薬との接触、反応がより確実に行なわれ得る。

第18a図は、通路50内に凹部33aが設けられた構体2の凹部形成部分の断面図である。また、第18b図は、通路50内に小突起35a、35b、35cが設けられた構体2の小突起形成部分の断面図である。さらに、

検体中の被測定物質が試薬固定部分30の試薬が充分反応した後に試薬固定部分30に到達する。

さらに、第6b図、第7b図および第8b図に示す例のように、通路の途中に大容積部を設け、該大容積部を試薬付着領域S、Tとし、該試薬付着領域S、T内に試薬付着部分40、41を設けてもよい。そして、1個の試薬付着領域内には1ヶ所だけ試薬が付着されるとは限らず、第8b図のように、試薬付着領域T内に2個の試薬付着部分41があってもよい。このような反応容器が例えば検体中の抗原をサンドイッチ法によってEIA法で測定する容器であれば、酵素標識抗体と酵素の基質とを付着させておくと、検体を添加するだけで、全ての反応を行なわせ得る。

尚、試薬付着部分に付着される試薬としては、検体中の被測定物質あるいは試薬固定部分に固定されている試薬と結合する例えば標識抗原、標識抗体、標識ハプテン、標識DNA等、

第18c図は、通路50内に凹部33aが設けられ、その凹部33aに、小突起35a、35b、35c、35d、35eが設けられた構体2の凹部および小突起形成部分の断面図である。このような凹部や小突起集合体は、公知の方法で作ることが出来、それらは通路の形成と同時に作ってもよいし、後で作ってもよい。

尚、通路内の所定の位置に凹部を設け、その凹部に試薬を固定する場合、先に説明した第17a図、第17b図および第17c図のように、試薬固定領域Xを形成し、該試薬固定領域X内に、凹部33a、33b、33c、33d、33e、33f、33g、33h、33iを、扇形、「+」形等に形成することが好ましい。

また、試薬固定部分を小突起集合体で形成する場合も、小突起集合体を扇形や「+」形等に配置することが好ましい。

小突起集合体35を構成する個々の小突起

35a、35b、35c、35d、35e、35fの形状は、第19a図、第19b図および第19c図に示すように、円柱あるいは角柱、さらには先端がふくらんだ円柱が適当である。

小突起の横断面の径あるいは辺の大きさは、 $0.3\mu\text{m} \sim 1.0\text{mm}$ 程度であるのが好ましい。

小突起の高さは、通路の断面積に関係するが、 $0.5 \sim 2.0\text{mm}$ 程度であるのが好ましい。

小突起の間隔の大きさは、この小突起の間に液体が保持される程度とする。

このような液体の保持は、表面張力や毛細管現象により生じるものと考えられるから、表面張力や毛細管現象が働く程度の大きさが好ましい。しかし、あまり小さすぎると、検体や反応溶液等の液体の小突起間への侵入がスムーズに行なわれなかったり、B/F分離の際の洗浄が十分に行なわれなかったりする不都合が生

また、通路ごとに固定する試薬をかえれば、第10図、第11図あるいは第12図に示した容器を用いるよりも、さらに多項目の同時測定が可能である。

### 特開平3-223674(14)

ずるので、そのような不都合の生じない程度の大きさが必要である。そのような大きさとしては、小突起間の距離が $0.5 \sim 1.5\text{mm}$ 程度であるのが好ましい。

凹部や小突起の集合体を設けると、表面積が大きくなるので、固定あるいは付着される試薬量が増え、また、液体が凹部や小突起間に保持されるので、特に試薬固定部分(領域)での判定や測定を色によって行なう場合、その深さ(高さ)のために、色が濃くみえるようになり、測定精度が高くなる。

本発明は、この他、以上説明してきた様々な構成の反応ユニットが、複数個並列されてなる反応容器も包含する。例えば、第20図や第21図にその部分平面図を示す反応容器である。

本発明の反応ユニットが複数個並列されてなる反応容器では、多数の検体を、あるいは検体と対照溶液または標準溶液とを、同時に、同条件で反応させうる。

以上、本発明の反応容器の構成について説明してきたが、次に、本発明の反応容器使用時の液体の動きについて説明する。

本発明の反応容器を用いる場合、添加された液体の動きは、概ね5種類に分けられる。

その第一は、例えば第1a図や第2a図に示される容器を用いる場合であって、検体等の液体が次々添加され、通路内が満たされると、順次液体が排出されるものである。

その第二は、第4図で示される例のように、試薬固定部分30が通路50の比較的上流側にあり、通路50の試薬固定部分30よりも下流側に、液体貯留部90になっている容器における液体の動きである。

検体中の被測定物質が抗原であり、試薬固定部分30には被測定物質に対するモノクローナル抗体が固定され、試薬付着部分40には酵素標識モノクローナル抗体が付着されている場合を例に、第4図について説明する。

① 検体が、同図中1で示される位置まで添

## 特開平3-223674 (15)

加される。

② 洗浄液が添加され、検体の先端は、同図中Ⅱで示される位置となる。

③ 酵素の基質溶液が添加され、検体の先端は、同図中Ⅲで示される位置となる。

④ 洗浄液が添加され、検体の先端は、同図中Ⅳで示される位置となる。

⑤ クロモゲン溶液が添加され、検体の先端は、同図中Ⅴで示される位置となる。

このように、順次添加された液体は、全て反応容器内に保持され、流出しない。

尚、第5図に示す例のように、液体貯留部90の少なくとも一部が吸水性材料81が収納された吸水性材料収納領域80となっている場合、添加された液体は、順次、全てが吸水性材料81に吸収され、保持されるが、液体の動きは第二の場合と同様である。

その第三は、例えば第6b図や第8b図に示される容器のように、液体入口が1個で、かつ通路が分岐している容器における液体の動きで

④ 液体滞留部70および毛管部分51が空になったら、続いて切れ目なく、毛管部分55、試薬付着領域Tに満たされた検体が、毛管部分52→試薬付着領域S→毛管部分53→試薬固定領域X→毛管部分54→吸水性材料収納領域80のように動く。

このように、通路を分岐させ、反応の順序に従って試薬が供給されるように試薬を通路内の適当な位置に付着させておけば、検体のみの添加により、全反応を終了させることができる。

その第四は、前記第三の場合の変形であり、例えば第9b図に示す例のように、試薬付着部分40が流体入口10よりも上流側にある容器における液体の動きである。なお、前記したように、第9a図、第9b図および第9c図に示す例は、通路上面が直接密閉されていないため、特に出口は設けていない。

検体中の被測定物質が抗原であり、試薬固定部分30には被測定物質に対するモノクローナ

ある。

検体中の被測定物質が抗原であり、試薬固定領域X内の試薬固定部分30には被測定物質に対するモノクローナル抗体が固定され、試薬付着領域S内の試薬付着部分40には酵素標識モノクローナル抗体が、また、試薬付着領域T内の試薬付着部分41には酵素の基質が付着されている場合を例に、第6b図について説明する。

① 検体が流体入口10から添加され、液体滞留部70を満たす。

② 検体が、毛管部分51および52を通過して試薬付着領域Sに、同時に、毛管部分51および55を通過して試薬付着領域Tに達する。

③ 毛管部分55、試薬付着領域Tが検体で満たされた後は、検体は、液体滞留部70→毛管部分51→毛管部分52→試薬付着領域S→毛管部分53→試薬固定領域X→毛管部分54→吸水性材料収納領域80のように動く。

ル抗体が固定され、試薬付着部分40には蛍光標識モノクローナル抗体が付着されている場合を例に、第9b図について説明する。

① 検体が流体入口10から添加され、液体滞留部70を満たす。

② 検体が、液体滞留部90および試薬付着領域Tにむかって、同図中、液体滞留部70の左右の通路50aおよび50bに流入する。

③ 通路50aに流入した検体が、試薬固定領域Xに到達し、検体中の抗原がここに固定され、検体は、さらに、通路50c→吸水性材料収納領域80と移動する。

④ 液体滞留部70が空になったら、続いて切れ目なく、通路50bにある、蛍光標識モノクローナル抗体を溶解した検体が、通路50a→試薬固定領域X→通路50c→吸水性材料収納領域80と移動する。

このように、試薬付着領域Tを流体入口10よりも上流側に設けると、検体中の被測定物質と標識物との試薬固定領域Xへの到達時間の差

## 特開平3-223674 (16)

が大きくなり、被測定物質が試薬固定領域Xに十分に固定される。

なお、必要に応じ、流体入口10から洗浄液を添加し、未反応の蛍光標識モノクローナル抗体を試薬固定領域から十分に除去するとよい。

その第五は、例えば第3a図、第3b図および第3c図にその分解した各構成部品の平面図を示す例や、第7a図および第7b図にその分解した各構成部品の平面図を示す例のように、流体入口が複数ある容器における液体の動きである。

第3a図、第3b図および第3c図にその分解した各構成部品の平面図を示す例では、流体入口10から添加された検体が、液体滞留部70→毛管部分53→狭隙部60→毛管部分54→出口20のように動き、一方、流体入口11から添加された緩衝液または反应用溶液等は、液体滞留部71→毛管部分51→狭隙部61→毛管部分52→通路の連通部56→通路

固定部分30、31、32を通過するというように構成してもよいし、逆に、流体入口11、12、13から相異なる試薬や検体を添加し、各々試薬固定部分30、31、32を通過させた後、流体入口10から添加された反应用溶液が、試薬固定部分30、31、32を通過する構成としてもよい。

続いて、本発明の反応容器の使用方を、被測定物質が抗原である場合を例に説明する。

本発明の抗体が固定された例えば第1a図に示すような反応容器を使用して、検体中の抗原をサンドイッチ法で測定する場合の操作手順は、以下の通りである。

① 流体入口10より、被測定物質である抗原が含有されていることが予測される検体を入れ、通路50内の試薬固定部分30に固定されている抗体と検体中の抗原とを結合させる。

② 流体入口10より、標識抗体の溶液を入れ、試薬固定部分30に固定されている抗体と結合した抗原と標識抗体とを結合させる。

の連通部57→毛管部分54→出口20のように動く。従って、流体入口10から添加された検体が試薬固定部分30を通過した後に、流体入口11から添加された液体が試薬固定部分30を通過する。

第7a図および第7b図にその分解した各構成部品の平面図を示す例も、流体入口10から添加された検体が、はじめに試薬固定領域Xを通過し、その後、流体入口11から添加された検体、緩衝液または反应用溶液等が試薬固定領域Xを通過する構成である。

また、第11図も複数の流体入口を有する容器であるが、このような容器は、試薬固定部分30、31、32の各々に固定された試薬と各々反応する試薬や検体を混合して添加することが出来ない場合に有利である。

第11図に示される容器では、流体入口10から添加された検体が試薬固定部分30、31、32を通過した後に、流体入口11、12、13から添加された反应用溶液等が試薬

③ 必要であれば洗浄後、標識の示すシグナルに基づき、抗原量を測定、あるいは抗原の有無を判定する。

また、競合法で測定する場合の操作手順は、以下の通りである。

① 流体入口10より、検体を入れ、毛管通路50内の試薬固定部分30に固定されている抗体と検体中の抗原とを結合させる。

② 流体入口10より、標識抗原の溶液を入れ、通路50内の試薬固定部分30に固定されている抗体と結合させる。

③ 必要であれば洗浄後、標識の示すシグナルに基づき、抗原量を測定、あるいは抗原の有無を判定する。

なお、サンドイッチ法の場合は検体と標識抗体を、また、競合法の場合は検体と標識抗原とを、単一の流体入口から、同時に流入させてもよい。

ここで、標識とは、色素、放射性同位元素、酵素、蛍光または発光物質等のいわゆる標識剤



## 特開平 3-223674(17)

を指し、抗体や抗原、ハプテン等へのこれらの標識剤の結合は、公知の方法によればよい。

また、標識の示すシグナルの測定は、標識剤が酵素である場合は、基質を添加して酵素活性を測定し、標識剤が放射性同位元素である場合は、その放射活性を測定し、標識剤が色素、蛍光または発光物質である場合は、各々それらを測定すればよい。

第 2 a 図に示すような試薬付着部分 40 を有する反応容器を使用して、抗原をサンドイッチ法で測定する場合の操作手順は、以下の通りである。

① 流体入口 10 より、検体を入れ、通路の毛管部分 52 内の試薬付着部分 40 に付着されている標識抗体と検体中の抗原とを結合させ、続いて、試薬固定部分 30 に固定されている抗体と結合させる。

② 必要であれば洗浄後、標識の示すシグナルに基づき、抗原量を測定、あるいは抗原の有無を判定する。

第 6 a 図、第 6 b 図および第 6 c 図に示す例の場合は、流体入口 10 から検体を入れるだけでよい。すなわち、この例が酵素標識抗体を用いるサンドイッチ法用の容器である場合、試薬固定領域 X の試薬固定部分 30 にはモノクローナル抗体が固定され、試薬付着領域 S の試薬付着部分 40 には酵素標識抗体、試薬付着領域 T の試薬付着部分 41 には酵素の基質が付着されている。そこで、流体入口 10 より検体を流入させれば、はじめに検体中の抗原と試薬付着領域 S の試薬付着部分 40 にある酵素標識抗体とが結合し、これが試薬固定領域 X の試薬固定部分 30 にあるモノクローナル抗体と結合して固定され、ここに試薬付着領域 T の試薬付着部分 41 に付着されていた基質が到達し、発色等のシグナルを示すので、そのシグナルを測定すればよい。

多項目同時測定を行う場合は、例えば第 10 図に示すような反応容器を用い、以下のように操作する。

また、競合法の場合は、試薬付着部分 40 に標識抗原が付着されており、試薬固定部分 30 には抗体が固定されている反応容器を用い、サンドイッチ法の場合同様、検体を通路に流入させ、検体中の抗原と標識抗原とを、競合させて試薬固定部分 30 に固定されている抗体と結合させた後、標識の示すシグナルを測定すればよい。

さらに、第 3 a 図、第 3 b 図、第 3 c 図、第 3 d 図、第 3 e 図および第 3 f 図に示すような、試薬付着部分 40 に蛍光標識抗体が付着されている反応容器を使用し、抗原をサンドイッチ法で測定する場合は、流体入口 10 より検体を、流体入口 11 より緩衝液を流入させれば、試薬固定部分 30 には、まず、検体中の抗原が到達し、ここに固定されている抗体と結合し、その後、蛍光標識抗体が到達し、ここに固定されている抗原-抗体結合物と反応するので、必要であれば洗浄後、蛍光強度を測定すればよい。

① 流体入口 10 より、検体を入れ、検体中の 3 種の抗原と、試薬固定部分 30、31、32 に固定されている互いに交差反応性を有しない各抗原に対応する抗体とを、各々結合させる。

② 流体入口 10 より、標識抗体 3 種の混合液を入れ、試薬固定部分 30、31、32 に固定されている各抗体に結合した各抗原と、対応する標識抗体とを結合させる。

③ 必要であれば洗浄後、標識の示すシグナルを測定する。

尚、3 種の標識抗体の標識剤の種類は、同じであっても異なってもよい。また、試薬固定部分 30、31、32 に、検体中の被測定物質に対応する抗体と対照物質に対応する抗体とが固定されていれば、被測定物質と対照物質との同時測定が行える。

また、例えば第 7 a 図、第 7 b 図、第 7 c 図および第 7 d 図に示すような容器を用い、3 種の被測定物質を同時測定する場合は、以下のよ

## 特開平3-223674 (18)

うに操作する。

① 流体入口10より、検体を入れ、必要に応じて攪拌を行ない、検体中の3種の抗原と試薬付着領域Sの試薬付着部分40に付着されている、例えば前記3種の抗原の共通認識部位に対して形成された酵素標識抗体とを結合させる。続いて、3種の抗原-酵素標識抗体結合物を、試薬固定領域Xの試薬固定部分30、31、32に固定された3種の抗原の非共通認識部位に対して形成された抗体と結合させ、固定する。

② 流体入口11より、検体または緩衝液を入れ、試薬付着領域Tの試薬付着部分41に付着されている酵素の基質を溶解する。酵素の基質は、前記抗原-酵素標識抗体結合物が試薬固定領域Xの試薬固定部分30、31、32に固定された後に、試薬固定領域Xに到達する。

③ 必要であれば洗浄後、その状態が第7c図から第7d図に変化したら、基質の示すシグ

ナルを測定する。

④ 必要であれば洗浄後、標識の示すシグナルを測定する。

以上、本発明の反応容器について説明してきたが、ここで、図示した好適実施例について、簡単にその特徴を述べる。

第1a図および第1b図に示された例は、本発明の反応容器の最も単純なものである。

第2a図、第2b図および第2c図に示された例は、液体滞留部70、狭路部60および試薬付着部分40を有するので、流速が制御され、十分な反応時間が確保され、かつ反応用試薬の添加回数が少なくすむ。

第3a図、第3b図、第3c図、第3d図、第3e図および第3f図に示された例は、流体入口が2ヶ所あるので、複数の液体を同時に添加できる。

第4図、第5図、第6a図、第6b図および

ナルを測定する。

このような反応容器は、検体が乳幼児の血清である場合等、少量である場合に有効である。

尚、上記反応容器において、試薬付着領域Sには、3種の抗原の非共通認識部位に対して形成された3種の標識抗体の混合物が付着されていてよい。さらには、上記反応容器は、1種または2種の被測定物質を測定するために、試薬固定領域Xや試薬付着領域Sに、各々1種または2種の試薬が固定されたものであってもよい。

検体と標準溶液とを同時測定する場合は、例えば第11図に示すような反応容器を用い、以下のように操作する。

① 流体入口11より検体を、流体入口12および13より、濃度の異なる標準溶液を入れ、試薬固定部分30、31、32に固定されている同一の抗体と、各々の試料(検体および標準溶液)中の抗原とを結合させる。

② 流体入口10より、単一の標識抗体の溶

液を入れ、試薬固定部分30、31、32に固定されている抗体に結合した抗原と結合させる。

第6c図、第7a図、第7b図、第7c図および第7d図、さらには第8a図、第8b図、第8c図、第8d図および第8e図に示された例や、第9a図、第9b図および第9c図に示された例は、液体滞留部があるので、添加された液体が容器外に流出しない。そのため、汚染や感染が生じないので好ましい。

また、第6a図、第6b図および第6c図、第7a図、第7b図、第7c図および第7d図、第8a図、第8b図、第8c図、第8d図および第8e図に示された例は、通路の液体滞留部を含む上流通路部分と、液体滞留部を含む下流通路部分が、構体の重心の互いに反対側に存在する反応容器であり、前記流体入口から液体滞留部に流入した液体が、構体内の通路を経て所定の反応を行ないつつ液体滞留部に向かって流れ、所定の反応が実質的に終了した時に、流入した液体の移動の結果として、構体の液体滞留部の存在する側が下降するように揺動手段が設けられているものである。揺動手段は、脚

## 特開平3-223674 (19)

(第6c図中9a)、曲面を有する台(第7c図参照、ただし、第7c図は割型と台が一体成形されている)、あるいは平面を有する台(第8d図中9b)である。

さらに、第6a図、第6b図および第6c図に示された例では、検体のみの1回の添加で全工程の反応を終了させうるという特徴も有し、また、このような容器を型成形するに際し、出口20が第6b図中で示される位置にあるために、離型を行ない易いという特徴もある。

第7a図、第7b図、第7c図および第7d図に示された例は、さらに、検体が少量であっても、多項目同時測定を行なえる点、および通路の一部が親水性条体59で代替されているので、流速が精密に制御され、反応の精度が高いという特徴も有する。また、型成形の場合の離型性については、第6a図、第6b図および第6c図に示された例と同様である。

第8a図、第8b図、第8c図、第8d図および第8e図に示された例は、検体のみの1回

の添加で全工程の反応を終了させ得る点、また、二種の被測定物質を同時に測定し得るという特徴を有する。さらに、この例も、第7a図、第7b図、第7c図および第7d図に示された例と同様に、通路の一部が親水性条体59で代替されているので、流速が精密に制御され得る。

第9a図、第9b図および第9c図に示された例は、被測定物質と試薬固定領域Xに固定された試薬との反応時間を十分に確保できるという特徴を有する。

第10図や第12図に示された例は、単純な構成であるが、多項目同時測定が行なえるという特徴がある。

第11図に示された例は、多項目同時測定に用いれば、互いに干渉する被測定物質を同時に測定できるという特徴があり、また、別の用途として、多種検体の同時測定にも供せるとい

う特徴を有する。

第20図や第21図に示された例は、集団健

診等に有用な、多項目、多検体同時測定が可能な容器である。

このように、本発明の反応容器は、その構成がバリエーションに富んでおり、いろいろな測定方法に適応させることができる。

本発明の反応容器は、手作業による測定、判定はもちろんのこと、自動化装置による測定、判定にも用いることができる。例えば特開昭63-69539号公報記載の化学反応装置において、毛細管のかわりに本発明の反応容器を搬送手段に保持させれば、自動化測定が可能である。

具体的には、ベルトコンベア等の搬送手段と、検体、試薬、洗浄液等の供給部と、例えば光学的な測定手段とを有する装置に、通路内に抗体が固定され、酵素標識抗体が付着された本発明の反応容器を載せ、抗原を含有することが予測される検体、洗浄液、酵素の基質溶液を順次自動的に注入した後、基質の示す色を吸光度として測定すればよい。尚、注入された液体

は、出口から吸引除去してもよい。測定値は、必要であればコンピュータによって解析し、診断の一助とする。

## &lt;実施例&gt;

以下に、実施例に基づき、本発明を具体的に説明する。

## (実施例1)

第2a図、第2b図および第2c図に示す形状の反応容器を用いる妊娠反応について説明する。

## ① 反応容器の製造

白色のプラスチック（ポリアクリル樹脂製）からなる割型5の通路の毛管部分52の試薬固定部分30に、モノクローナル抗ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）抗体を、抗体を不溶化担体に結合させるための公知の方法により固定化する。

次に、同じく割型5の通路の毛管部分52の試薬付着部分40に、アルカリフォスファターゼで標識されたモノクローナル抗hCG抗体（以下、標識抗体Aという）の溶液（ $50 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ ）を $0.05 \text{ m}\ell$ 滴下する。

これを凍結乾燥した後、上部に、無色透明の

ると、尿の進入は停止する。

次に、酵素の基質であるクロモゲンBCIP（5-bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphate）の溶液（以下、基質溶液Aという）を液体滞留部70に充填すると、該基質溶液Aが通路の毛管部分52内に進入すると同時に、尿が再び進入し、ついには尿全てが排出される。

前記基質溶液Aが試薬固定部分30に達すると、ここに固定化された酵素の働きでBCIPが青色に変色する。これは、尿中にhCGが存在することを示し、妊娠と判定することができる。妊娠していない人の尿を用いると、尿中にhCGが存在しないので、標識抗体Aは試薬固定部分30に固定化されず、全て出口20から流出してしまう。従って、試薬固定部分30は着色しない。

## (実施例2)

第3a図、第3b図、第3c図、第3d図、第3e図および第3f図に示す形状の反応容器を用いる妊娠反応について説明する。ただ

## 特開平3-223674(20)

プラスチック（ポリアクリル樹脂製）からなる割型4を接着する。

尚、通路の毛管部分51および52は、各々横幅3mm、深さ $0.2 \text{ mm}$ である。

## ② 測定

妊娠した女性の尿少量をビペットに採取し、流体入口10から滴下し、液体滞留部70に充填させる。尿は、狹隘部60で進入速度をコントロールされ、徐々に通路の毛管部分52内に進入する。尿が試薬付着部分40に達すると、ここに付着されている標識抗体Aを溶解し、標識抗体Aを尿中のhCGと結合させながら、さらに通路の毛管部分52内を進入する。

尿が試薬固定部分30に達すると、hCGと標識抗体Aとの結合物が、ここに固定されているモノクローナル抗hCG抗体と結合し、固定化される。その後、尿はさらに通路の毛管部分52内を進入し、固定化されなかった余分の標識抗体Aを多量に溶解している尿は、出口20に達する。尚、液体滞留部70が空にな

し、図示されている試薬付着部分40の他に、液体滞留部70内にも試薬が付着された試薬付着部分を有する容器を用いた。

## ① 反応容器の製造

白色のプラスチック（ポリスチレン樹脂製）からなる割型5の通路の毛管部分54の試薬固定部分30に、モノクローナル抗hCG抗体を、抗体を不溶化担体に結合させるための公知の方法により固定化する。

次に、同じく割型5の液体滞留部70内に、標識抗体A（既出）の溶液（ $100 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ ）を $0.05 \text{ m}\ell$ 滴下し、狹隘部60より先に進入しないように注意して凍結乾燥する。これとは別に、図中7で示した部分は透明で、他は白色のプラスチックからなる割型4の通路の毛管部分52の試薬付着部分40に、基質溶液A（既出、 $10 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ ）を滴下し、凍結乾燥する。

上記処理を行なった割型5の上に割型4を接着し、さらにその上に、図中6で示した部分は

## 特開平3-223674(21)

透明で、他は白色のプラスチック（ポリスチレン樹脂製）からなる蓋体3を接合する。

尚、通路の毛管部分51、52、53、54は、各々横幅2mm、深さ0.2mmである。

## ② 測定

妊娠した女性の尿少量をピペットに採取し、流体入口10から滴下し、液体滞留部70に充填させると同時に、ここに付着されている標識抗体Aを溶解する。ついで、直ちに、同じ尿を流体入口11から滴下し、液体滞留部71に充填させる。

液体滞留部70に充填された尿は、狹隘部60を通り、徐々に通路の毛管部分54内に進入する。この際、尿中のhCGと標識抗体Aが結合しながら、通路の毛管部分54内を進入する。尿が試薬固定部分30に達すると、hCGと標識抗体Aとの結合物が、ここに固定されているモノクローナル抗hCG抗体と結合し、固定化される。その後、尿はさらに通路

の毛管部分54内を進入し、固定化されなかった余分の標識抗体Aを多量に溶解している尿は、出口20に達する。

一方、液体滞留部71に充填された尿は、狹隘部61を通り、通路の毛管部分52内を蛇行して前進し、試薬付着部分40に到達し、ここに付着されているBCIP（基質、既出）を溶解する。尿は、通路の連通部56、57を経て、通路の毛管部分54内に進入する。尚、通路の毛管部分52の全長は、通路の毛管部分54の全長より長くしてある。従って、基質を溶解した尿は、標識抗体Aを溶解した尿全てが試薬固定部分30を通過した後、試薬固定部分30に到達する。

基質を溶解した尿が試薬固定部分30に達すると、ここに固定化された酵素の働きで、基質は時間の経過と共に青色に変化し、尿中にhCGが存在すること、即ち使用された尿が妊娠尿であることが、蓋体3の6部分および剖型4の7部分を通して確認される。尿中に

hCGが存在しない場合は、標識抗体Aは試薬固定部分30に固定化されず、全て出口20から流出してしまう。従って、試薬固定部分30は青色とならない。

## （実施例3）

第20図に示す形状の反応容器を用いる癌マーカー3種の同時自動化測定について説明する。

## ① 反応容器の製造

白色のプラスチック（ポリスチレン樹脂製）からなる剖型のひとつの通路50内の試薬固定部分30、31、32に、hCG、CEA、α-フェトプロテイン（以下3種の癌マーカーという）に対するモノクローナル抗体を、抗体を不溶性担体に結合させるための公知の方法により、各々固定化する。他の通路50内にも、同様に、3種の癌マーカーを固定化する。

次に、上記の剖型の上部に、無色透明のプラスチック（ポリスチレン樹脂製）からなる蓋体

を接合する。

このようにして得られた反応容器1は、横幅3mm、深さ0.3mmの通路50が、平行に10本並んだものである。

## ② 自動化測定装置

ここで用いる自動化測定装置は、一定のピッチで縦横に動かすことのできる搬送手段と、検体、試薬、洗浄液等の供給部と、毛管通路内の流体を出口から吸引する吸引手段と、光学的な測定手段とを有する。

尚、ここで用いる自動化測定装置は、測定手段を除き、10検体を同時に処理できる構造となっている。

## ③ 測定

自動化装置の搬送手段に、反応容器を載置する。

反応容器が搬送され、所定の位置に達すると、ヒト血清1～10が、検体供給部にある10本の検体供給用ノズルから、各流体入口10を経て各通路50に供給され、血清中の被

## 特開平3-223674(22)

測定物質(3種の癌マーカー)が、試薬固定部分30、31、32に固定された各抗体に結合し、固定化される。

5分経過後(この間に、反応容器は洗浄液供給部まで搬送される)、ヒト血清№1~№10は、各通路50の各出口20から吸引除去される。続いて、各通路50に洗浄液が供給され、これも吸引除去される。尚、洗浄、吸引操作は5回行われる。

反応容器が試薬供給部まで搬送されると、酵素標識抗体(この場合、前記hCG、CEA、 $\alpha$ -フェトプロテイン各々に対する抗体にアルカリフォスファターゼを標識したものの混合物)を溶解した緩衝液が供給される。

酵素標識抗体は、対応する癌マーカーと結合することにより、試薬固定部分30、31、32に固定されている抗体と結合し、固定化される。癌マーカーが固定化されていない固定化抗体とは結合しない。

5分経過後(この間に、反応容器は洗浄液供

給部まで搬送される)、酵素標識抗体溶液は吸引除去される。続いて、各通路50に洗浄液が供給され、これも吸引除去される。尚、洗浄、吸引操作は5回行われる。

この操作が終了し、反応容器が試薬供給部まで搬送されると、各通路50に基質溶液A(既出)が供給される。

本実施例の場合、癌マーカーが存在するため酵素標識抗体が固定化された試薬固定部分は青色に変化する。この青色の呈色は、検体血清中に含有される癌マーカーの濃度に比例する。

次に、反応容器は測定手段の位置まで搬送される。ここで、試薬固定部分30、31、32の呈色が連続的に測光され、各血清中の各癌マーカーが定量される。

反応容器は順次自動送りされ、次々と多数の血清が処理される。

(実施例4)

第21図に示す形状の反応容器を用いる癌

マーカー3種の同時自動化測定について説明する。

#### ① 反応容器の製造

白色のプラスチック(ポリスチレン樹脂製)からなる割型の第1ユニット100の通路の毛管部分52、53、54内の各試薬固定部分30、31、32に、各々、hCG、CEA、 $\alpha$ -フェトプロテイン(以下3種の癌マーカーという)に対するモノクローナル抗体を、抗体を不溶化担体に結合させるための公知の方法により固定化する。同様に、第2ユニット200以降のユニット同様の通路内にも、同位置に、3種の癌マーカーを固定化する。

次に、上記の割型の上部に、無色透明のプラスチック(ポリスチレン樹脂製)からなる蓋体を接着する。

尚、このようにして得られた反応容器1の通路の毛管部分51、52、53、54は、各々横幅5mm、深さ0.5mmである。

#### ② 自動化測定装置

ここで用いる自動化測定装置は、一定のピッチで動かすことのできる搬送手段と、検体、試薬、洗浄液等の供給部と、毛管通路内の流体を出口から吸引する吸引手段とを有する。

#### ③ 測定

自動化装置の搬送手段に、反応容器を載置する。

反応容器が搬送され、所定の位置に達すると、ヒト血清№1が、検体供給部から、第1ユニット100の流体入口10を経て第1ユニット100の通路の毛管部分51に供給される。

血清は、通路の毛管部分51から通路の毛管部分52、53、54に進出し、試薬固定部分30、31、32に到達すると、血清中の被測定物質(3種の癌マーカー)が、試薬固定部分30、31、32に固定された各抗体に結合し、固定化される。

2. 5分経過後(この間に、反応容器1は、

## 特開平3-223674 (23)

洗浄液供給部Aに第1ユニット100の流体入口10が、検体供給部に第2ユニット200の流体入口10が位置するよう搬送される)、ヒト血清No.2が、検体供給部から、第2ユニット200の流体入口10を経て第2ユニット200の通路の毛管部分51に供給される。同時に、第1ユニット100の出口20、21、22からのヒト血清No.1の吸引除去操作と、それに続く第1ユニット100の流体入口10からの洗浄液の供給および出口20、21、22からの吸引除去(5回)が行なわれる。

さらに、ヒト血清No.1の吸引除去操作後2.5分が経過したら(この間に、反応容器1は、試薬供給部Aに第1ユニット100の流体入口11、12、13が、検体供給部に図示しない第3ユニットの流体入口が位置するよう搬送される)、第1ユニット100の流体入口11から、hCGに対する抗体にアルカリフォスターゼを標識したものを溶解した緩衝液が、

さらに、酵素標識抗体を溶解した緩衝液の吸引除去操作後2.5分が経過したら(この間に、反応容器1は、試薬供給部Bに第1ユニット100の流体入口10が、検体供給部に図示しない第5ユニットの流体入口が位置するよう搬送される)、第1ユニット100の流体入口10から、基質溶液A(既出)が供給される。

本実施例の場合、癌マーカーが存在するために酵素標識抗体が固定化された試薬固定領域には、基質が固定化され、青色に着色する。

この青色は、基質溶液Aを除去した後も残留するので、基質溶液A供給後2.5分が経過したら(この間に、反応容器1は、洗浄液供給部Cに第1ユニット100の流体入口10が、検体供給部に図示しない第6ユニットの流体入口が位置するよう搬送される)、第1ユニット100の出口20、21、22からの基質溶液Aの吸引除去操作と、それに続く第1ユニット100の流体入口10からの洗浄液の供給およ

び流体入口12から、CEAに対する抗体にアルカリフォスターゼを標識したものを溶解した緩衝液が、流体入口13から、 $\alpha$ -フェトプロテインに対する抗体にアルカリフォスターゼを標識したものを溶解した緩衝液が供給される。

これらの酵素標識抗体は、対応する癌マーカーと結合することにより、試薬固定部分30、31、32に固定されている抗体と結合し、固定化される。癌マーカーが固定化されていない固定化抗体とは結合しない。

酵素標識抗体供給後2.5分が経過したら(この間に、反応容器1は、洗浄液供給部Bに第1ユニット100の流体入口10が、検体供給部に図示しない第4ユニットの流体入口が位置するよう搬送される)、第1ユニット100の出口20、21、22からの酵素標識抗体を溶解した緩衝液の吸引除去操作と、それに続く第1ユニット100の流体入口10からの洗浄液の供給および出口20、21、22からの吸引除去(5回)が行われる。

び出口20、21、22からの吸引除去(5回)までを自動化装置に行わせた後、肉眼で試薬固定部分30、31、32を観察し、癌マーカーの有無を判定する。

尚、第2ユニット200以降の通路に供給された血清も、順次、ワンステップ遅れで同様に処理される。

(実施例5)

第2a図、第2b図および第2c図に示す形状の反応容器を用いるB型肝炎診断について説明する。

## ① 反応容器の製造

白色のプラスチック(ポリスチレン樹脂製)からなる割型5の通路の毛管部分52の試薬固定部分30に、B型肝炎ウイルスDNAに対応するDNA片の熱変性溶液( $5\mu\text{g}/\text{ml}$ )を $20\mu\text{l}$ 滴下し、 $25^\circ\text{C}$ で24時間静置した後、吸引除去を行い、さらに紫外線照射を行い、DNA片を固定する。

次に、同じく割型5の通路の毛管部分52の

## 特開平 3-223674 (24)

試薬付着部分 40 に、ビオチン標識した B 型肝炎ウイルスの DNA プローブの溶液 ( $0.02 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) を  $10 \mu\text{L}$  滴下する。

これを凍結乾燥した後、上部に、無色透明のプラスチック (ポリスチレン樹脂製) からなる蓋体 3 を接着する。

尚、通路の毛管部分 51 および 52 は、各々横幅  $3 \text{ mm}$ 、深さ  $0.2 \text{ mm}$  である。

## ② 測定

肝炎患者の血清より DNA を抽出し、検体とした。

検体を、流体入口 10 から滴下し、液体滞留部 70 に充填させる。検体は、狭路部 60 で進入速度をコントロールされ、徐々に通路の毛管部分 52 内に進入する。検体が試薬付着部分 40 に達すると、ここに付着しているビオチン標識 DNA プローブを溶解し、ビオチン標識 DNA プローブと B 型肝炎ウイルスとを結合させながら、さらに通路の毛管部分 52 内を進入する。検体が試薬固定部分 30 に達すると、

ここに固定されている B 型肝炎ウイルスに対応する DNA 片に結合し、固定化される。その後、検体はさらに通路の毛管部分 52 内を進入し、固定化されなかった余分のビオチン標識プロローブを多量に溶解している検体は、出口 20 に達する。尚、液体滞留部 70 が空になると、検体の進入は停止する。

次に、あらかじめ調製しておいたアビジン-ビオチン標識ペルオキシダーゼ結合体溶液 ( $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) を流体入口 10 から滴下し、液体滞留部 70 に充填させる。アビジン-ビオチン標識ペルオキシダーゼ結合体溶液が通路の毛管部分 51 内に進入すると同時に、検体が再び進入し、ついには検体全てが排出される。

アビジン-ビオチン標識ペルオキシダーゼ結合体が試薬固定部分 30 に達すると、ここに固定化されているビオチンに結合し、固定化される。その後、アビジン-ビオチン標識ペルオキシダーゼ結合体溶液は、さらに通路の毛管部

分 52 内を進入し、出口 20 に達する。尚、液体滞留部 70 が空になると、アビジン-ビオチン標識ペルオキシダーゼ結合体溶液の進入は停止する。

この後、 $0.076 \text{ M}$  リン酸緩衝生理食塩水 ( $\text{pH } 7.0$ ) (PBS) を流体入口 10 から滴下し、液体滞留部 70 に充填させる。PBS は徐々に通路の毛管部分 51 から狭路部 60 を通って通路の毛管部分 52 内に進入し、アビジン-ビオチン標識ペルオキシダーゼ結合体溶液を押し出す。PBS が試薬固定部分 30 に達すると、洗浄が開始される。その後、PBS は、さらに通路の毛管部分 52 内を進入し、出口 20 に達する。尚、液体滞留部 70 が空になると、PBS の進入は停止する。

液体滞留部 70 が空になったら、過酸化水素 (基質) とオルトフェニレンジアミン (クロモゲン) との混合溶液を液体滞留部 70 に充填させる。該混合溶液が通路の毛管部分 51

内に進入すると同時に、PBS は排出される。

前記混合溶液が試薬固定部分 30 に達すると、ここに固定化された酵素の働きで、クロモゲンが黄色に変色する。これは、血清中に B 型肝炎ウイルスが存在することを示し、感染性が強いと判定することができる。血清中に B 型肝炎ウイルスが存在しない場合は、酵素は試薬固定部分 30 に固定化されず、全て出口 20 から流出してしまう。従って、試薬固定部分 30 は着色しない。

## (実施例 6)

第 8 a 図、第 8 b 図、第 8 c 図、第 8 d 図および第 8 e 図に示す形状の反応容器を用いる LH の測定について説明する。

## ① 反応容器の製造

形成型により、無色透明のプラスチック (エポキシ樹脂製) からなる蓋体 3 と割型 4、5 を成形する。尚、通路の毛管部分 51、52、53、54 および 55 は、各々横幅  $0.7$



## 特開平3-223674 (25)

mm、深さ0.7mmである。次に、割型4の通路の中空室58を含む毛管部分55に、直径0.5mmの円形の断面を有する木綿製糸（親水性糸体59）を、接着剤で固定する。

割型4の試薬固定領域Xの試薬固定部分30（この部分は、割型4の下側に通路が形成されている）に抗LH-β抗体を、抗体を不溶化担体に結合させるための公知の方法によって固定化した後、割型5を接着する。また、試薬固定部分31（この部分は、割型4の上側に通路が形成されている）に抗マウスIgG抗体を、抗体を不溶化担体に結合させるための公知の方法により固定化する。

次に、同じく割型4の試薬付着領域Sに、アルカリフォスファターゼで標識されたモノクローナル抗LH-α抗体（以下、標識抗体Bという）溶液（10μg/ml）を0.5ml滴下する。

さらに同じく割型4の試薬付着領域Tに、基質溶液A（既出、2mg/ml）を0.2ml

滴下し、凍結乾燥する。

その後、同じく割型4の吸水性材料収納領域80に不織布を30mg収納し、蓋体3を接着し、さらに台9bを接着する。

## ② 測定

尿をピペットに400μl採取し、流体入口10から滴下し、液体滞留部70に充滿させる。尿は、通路の毛管部分51内に侵入し、通路の毛管部分52を通過して試薬付着領域Tに達し、ここに付着されているBCIP（基質、既出）を溶解する。試薬付着領域Tが尿で満たされると、液体滞留部70内の尿は試薬付着領域Sに達し、ここに付着されている標識抗体Bを溶解するが、同時に尿中のLHが標識抗体Bと結合する。尿は、さらに、通路の毛管部分53、試薬固定部分30、通路の毛管部分54、試薬固定部分31、木綿製糸（親水性糸体59）を通過して吸水性材料収納領域80に達し、不織布（吸水性材料81）に吸収、保持される。この過程で、LHと標識抗体Bとの結

合物（LH-標識抗LH-α抗体）は、試薬固定部分30に固定されている抗LH-β抗体と結合し、同時に、試薬固定部分31に固定されている抗マウスIgG抗体と結合し、各々固定化される。液体滞留部70が空になると、基質を溶解した尿が試薬付着領域Tから流出し、通路の毛管部分52、通路の毛管部分51、試薬付着領域S、通路の毛管部分53、試薬固定部分30、通路の毛管部分54、試薬固定部分31、木綿製糸（親水性糸体59）を通過して吸水性材料収納領域80に達し、不織布（吸水性材料81）に吸収、保持される。この過程で、基質は試薬固定部分30および31に固定化された酵素の働きで青色に変色し、「+」と読める。これは、尿（検体）中にLHが存在することを示し、陽性と判定することができる。一方、LHが存在しない人の尿を用いると、標識抗体Bは試薬固定部分30に固定化されずに試薬固定部分31にだけ固定化される。従って、基質は試薬固定部分31に固定化さ

れた酵素の働きで青色に変色するが、試薬固定部分30は着色せず、「-」と読める。

尚、全反応時間は約5分間であり、尿中のLHが50mIU/ml以上の濃度であれば、「+」と判定することができる。

## &lt; 発明の効果 &gt;

本発明により、感度の高い測定を、操作、特にB/F分離操作を正確にしかも簡便に行うことができる反応容器が提供される。

本発明の反応容器は、様々な反応、例えばEIAや核酸ハイブリダイゼーションの機構を利用した検出方法に広く適用可能であり、簡便な操作での多項目測定にも適用でき、さらに、測定機器を使用しない測定にも、自動測定機器を使用する測定にも適用可能であるので、非常に有用性が高い。

本発明の反応容器は、定性的判定はもとより定量的測定にも適用可能であり、特に、従来困難であった定量的測定の簡便化を達成したとい

う点で、非常に有益である。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1a図は、本発明の一実施例の斜視図、第1b図は、その通路部分の断面図である。

第2a図は、本発明の一実施例の斜視図、第2b図および第2c図は、そのA-A線およびB-B線における矢視図である。

第3a図、第3b図および第3c図は、本発明の一実施例の分解した各構成部品の平面図、第3d図は、その側面図、第3e図および第3f図は、そのC-C線およびD-D線における矢視図である。

第4図は、本発明の一実施例の斜視図である。

第5図は、本発明の一実施例の平面図である。

第6a図および第6b図は、本発明の一実施例の分解した各構成部品の平面図、第6c図は、その側面図である。

第14d図、第14e図および第14f図は、本発明の反応容器の通路形状の一例を示す断面図である。

第15図は、本発明の反応容器の一形成方法を説明するための分解断面図である。

第16a図は、本発明の反応容器の一形成方法を説明するための分解斜視図、第16b図は、その反応容器の通路部分を示す断面図である。

第17a図、第17b図および第17c図は、複数の試薬固定部分の配置パターンを説明するための模式図である。

第18a図は、通路に設けられた凹部を、第18b図は、通路に設けられた小突起集合体を、そして、第18c図は、通路に設けられた凹部および小突起集合体を説明するための断面模式図である。

第19a図、第19b図および第19c図は、小突起集合体の一例を示す模式図である。

#### 特開平3-223674 (26)

第7a図及び第7b図は、本発明の一実施例の分解した各構成部品の平面図、第7c図および第7d図は、その側面図である。

第8a図、第8b図および第8c図は、本発明の一実施例の分解した各構成部品の平面図、第8d図は、その側面図、第8e図は、第8b図のA部分の拡大断面図である。

第9a図および第9b図は、本発明の一実施例の分解した各構成部品の平面図、第9c図は、そのX-X線における断面図である。

第10図は、本発明の一実施例の平面図である。

第11図は、本発明の一実施例の平面図である。

第12図は、本発明の一実施例の平面図である。

第13a図、第13b図および第13c図は、本発明の反応容器の通路形状の一例を示す平面図である。

第14a図、第14b図、第14c図、第

第20図は、本発明の一実施例の部分平面図である。

第21図は、本発明の一実施例の部分平面図である。

#### 符号の説明

- 1…反応容器、
- 2…構体、
- 3…(構体の)蓋体、
- 4、5…(構体の)割型、
- 6、7…試薬固定部分に対応する部分、
- 8…シート、
- 9a…脚、
- 9b…台、
- 10、11、12、13…流体入口、
- 20、21、22…出口、
- X、Y、Z…試薬固定領域、
- 30、31、32…試薬固定部分、
- 33a、33b、33c、33d、33e、
- 33f、33g、33h、33i…凹部、

## 特開平 3-223674 (27)

- 35 … 小突起集合体、  
 35 a、35 b、35 c、35 d、35 e、  
 35 f … 小突起、  
 S、T … 試薬付着領域、  
 40、41、42 … 試薬付着部分、  
 50、50 a、50 b、50 c … 通路、  
 51、52、53、54、55 … 毛管部分、  
 56、57 … 通路の連通部、  
 58 … 中空室、  
 59 … 親水性条体、  
 60、61 … 接合部、  
 63 … 突起部  
 65 … 接着剤、  
 67 … 隔壁、  
 70、71 … 液体滞留部、  
 80 … 吸水性材料収納領域、  
 81 … 吸水性材料、  
 90 … 液体貯留部、  
 100 … 第1ユニット、  
 200 … 第2ユニット

FIG. 1a

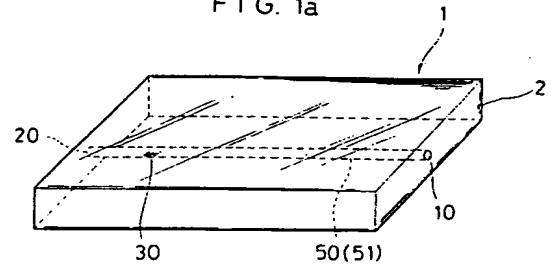


FIG. 1b

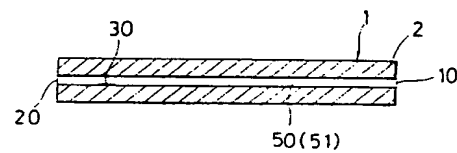


FIG. 2a

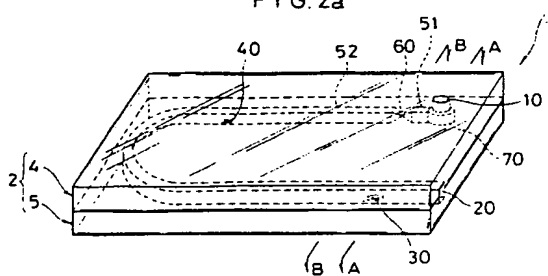


FIG. 2b

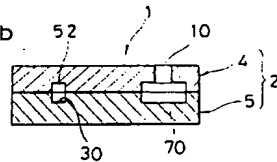


FIG. 2c

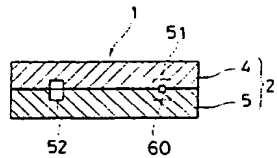


FIG. 3a

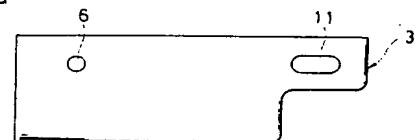


FIG. 3b

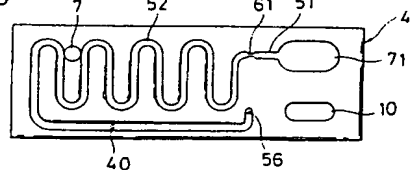
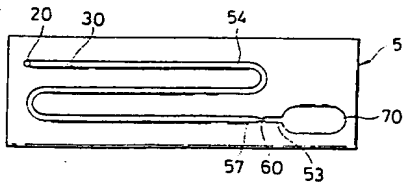


FIG. 3c



特開平 3-223674 (28)

FIG. 3d

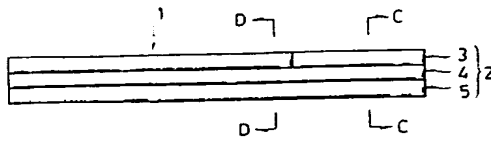


FIG. 3e

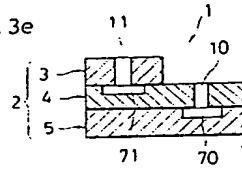


FIG. 3f

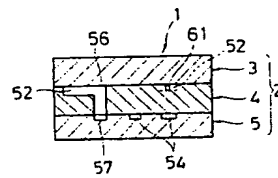


FIG. 6a

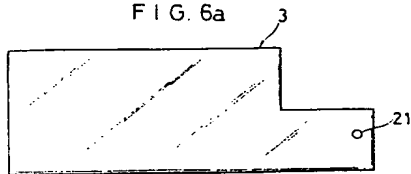


FIG. 6b

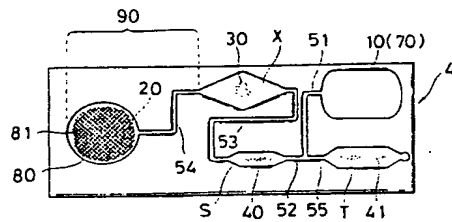


FIG. 6c

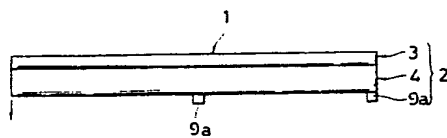


FIG. 4

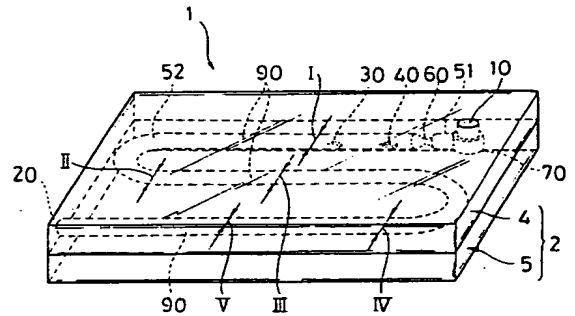


FIG. 5

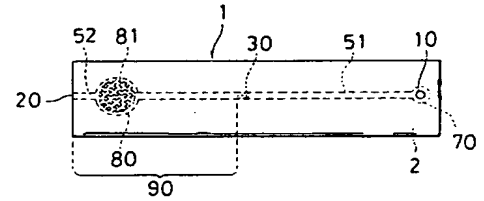


FIG. 7a

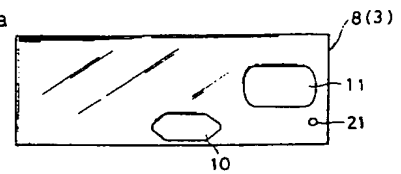


FIG. 7b

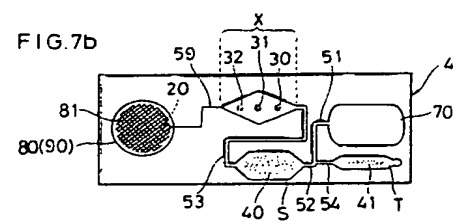


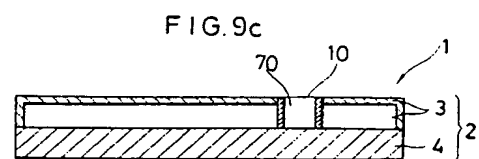
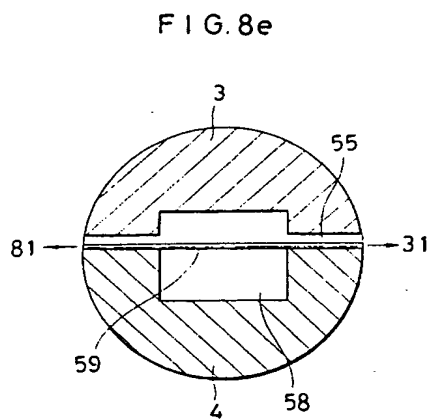
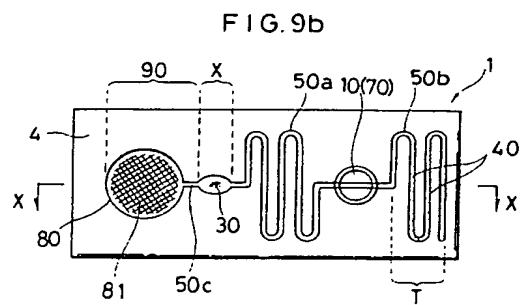
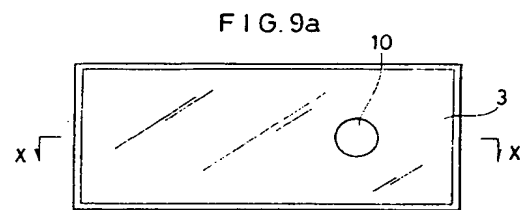
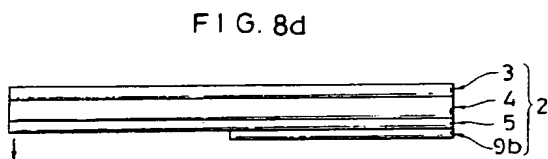
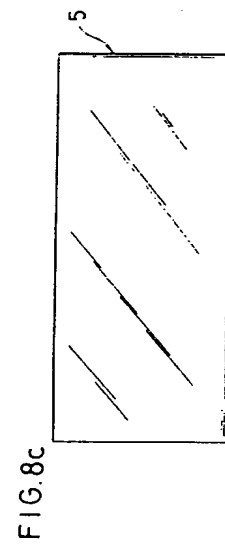
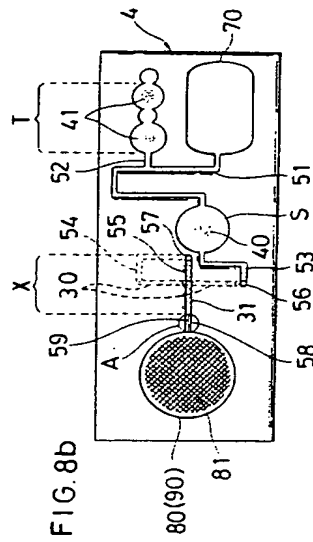
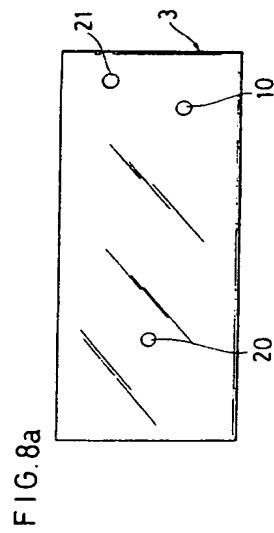
FIG. 7c



FIG. 7d



特開平 3-223674 (29)



特開平 3-223674 (80)

FIG. 10

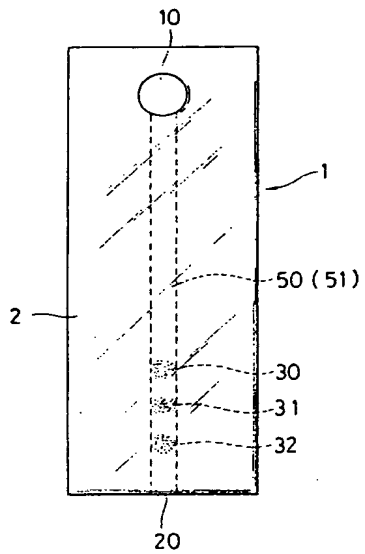


FIG. 11

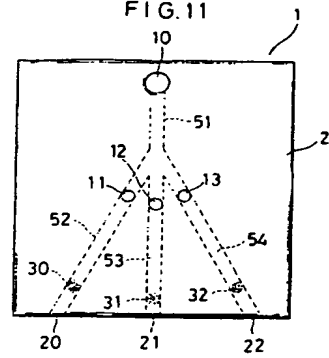


FIG. 12

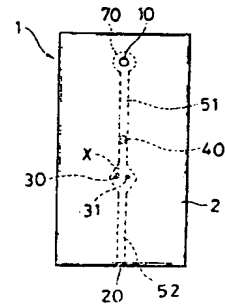


FIG. 14a

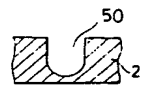


FIG. 14b

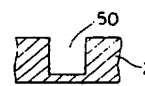


FIG. 14c

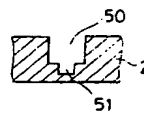


FIG. 14d

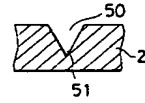


FIG. 14e

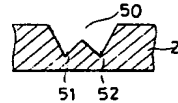


FIG. 14f

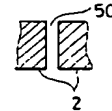


FIG. 13a

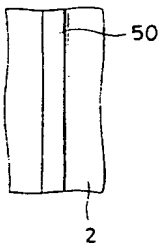


FIG. 13b

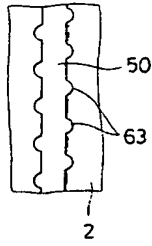


FIG. 13c

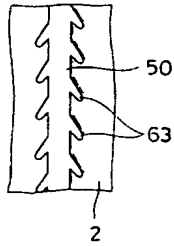
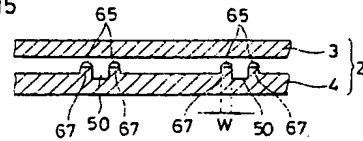
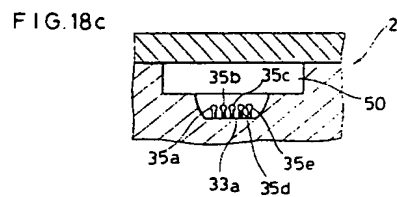
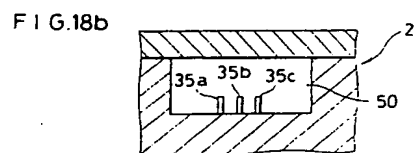
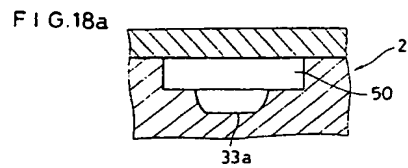
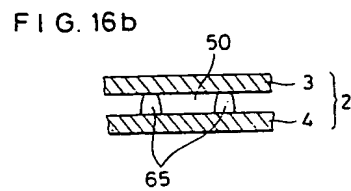
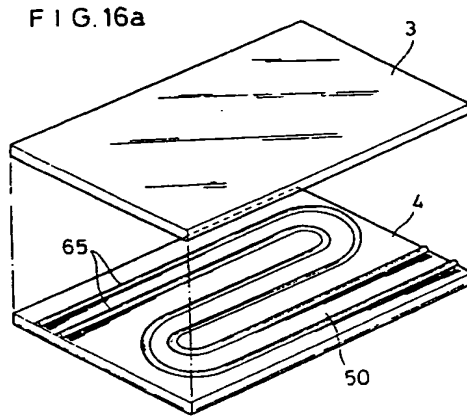


FIG. 15





## 特開平 3-223674 (81)

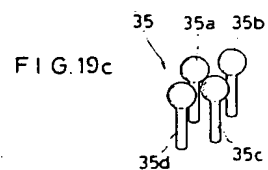
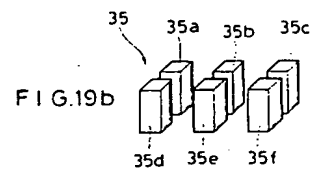
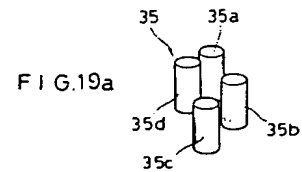
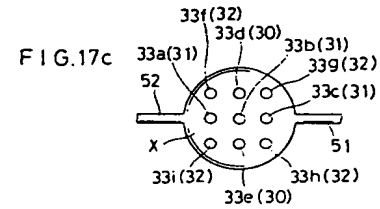
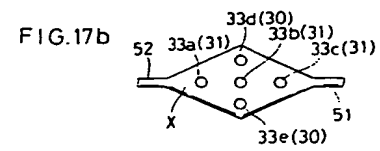
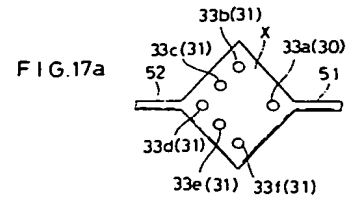


FIG. 20

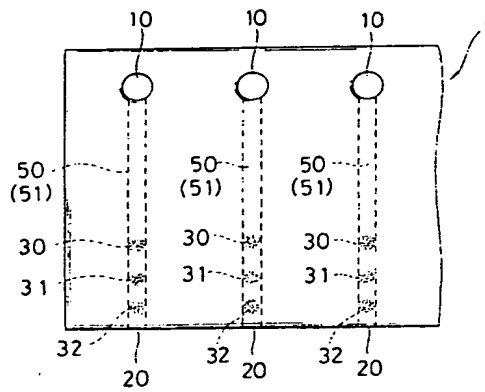


FIG. 21

